

文章编号:1000 - 0615(2001)02 - 0131 - 06

全雌鲮鱼培育的研究

方永强¹, 翁幼竹¹, 林君卓², 胡晓霞¹, 周 晶¹, 洪万树³

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 福建海洋研究所生物室, 福建 厦门 361012;
3. 厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

摘要:研究了性腺未分化年幼鲮鱼,通过口服不同剂量的 17 - 雌二醇控制其雌性化。研究结果表明,高剂量组被诱导为全雌鲮鱼,低剂量组雌性率达 90%,而对照组则为雄鱼。雌性性分化早于雄性。17 - 雌二醇在肌肉和胃肠道残留量低,残留时间短。

关键词:鲮鱼; 17 - 雌二醇; 性分化

中图分类号: S916.2 **文献标识码:** A

Studies on the cultivation of all-female in *Mugil cephalus*

FANG Yong-qiang¹, WENG You-zhu¹, LIN Jun-zhuo², HU Xiao-xia¹, ZHOU Jing¹, HONG Wan-shu³

(1. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, Fujian Institute of Oceanography, Xiamen 361012, China; 3. Oceanography Department, Xiamen University, Xiamen 361006 China)

Abstract: The paper was to investigate the control of sexual differentiation by oral administration of varying doses of 17 -estradiol (E₂) in juvenile grey mullet, *Mugil cephalus* with sexual undifferentiation. The results indicated that the grey mullets in the high dosage group were induced to be all-female, and 90% of the juvenile grey mullets in the low dosage group differentiated into female. The control group differentiated into all-males. Sexual differentiation into females occurred significantly earlier than in males. The residue level and residue time of 17 -estradiol were low and short in the muscle and gut of grey mullets.

Key words: *Mugil cephalus*; 17 -estradiol; sexual differentiation

鲮鱼 (*Mugil cephalus*) 是世界性养殖鱼类,在我国东南沿海都有养殖。鲮鱼生长快,肉质鲜美,抗病力强,是联合国粮农组织向第三世界推广养殖的种类^[1]。据我国台湾省有关资料报道,人工养殖鲮鱼雌雄比例,雌性只占养殖总数的 20% 左右,大多数为雄鱼。鲮鱼的商业价值就在腹部左右两侧的卵巢,不但价格高昂,更被捧为海产食物中的上品。因此,将雌鱼和雄鱼的商业价值作一比较就不难发现,雌鱼比雄鱼高 6~7 倍。究其原因在于成熟鲮鱼卵母细胞直径大,约 1.12~1.20 mm,金黄色,可替代大马哈鱼卵,加工为鱼仔酱,是最佳替代品,同时也是出口创汇拳头产品。然而,国内鲮鱼雌性化研究尚未开展,唯有台湾报道过培育雌性化鲮鱼^[2],但他们所用剂量大,且持续时间长。我们的特点是剂量低,持续时间短。因此,本研究对了解鲮鱼性分化机理有理论意义,并有长远应用前景。

收稿日期:2000-06-09

基金项目:福建省重中之重资助项目(全雌鲮鱼培育的研究)

第一作者:方永强(1937 -),男,福建云霄人,研究员,主要从事海洋动物生殖内分泌学的研究。Tel:0592-2195277, E-mail:fant98@public.xm.fj.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

鲮鱼苗购自厦门海区同一批捕捞天然苗种,体长 4~5 cm,体重 1.15~2.50 g,共 1000 尾。

1.2 方 法

1.2.1 土池养殖

将 1000 尾鲮鱼苗放在龙海大径福建省水产研究所苗种繁殖中试基地的土池中养殖。土池面积 0.133 公顷,用鱼网分隔为三块水面,为防止鲮鱼逃跑,便于取样,采用网中网法,即在每块小水面中又设置长、宽各 2 m,顶部加网盖的小网箱。实验设高剂量、低剂量和对照组。高、低剂量组各 350 尾,对照组 300 尾。实验前各组抽样解剖切片检查鱼苗性腺是否发育,正式实验是从 1999 年 5 月 17 日开始投喂 17-雌二醇(美国 Sigma 公司产品)饲料,其配制方法见文献[3],高剂量组每公斤饵料含性激素 50mg,低剂量组含 10mg,对照组含溶解性激素溶剂,而不含性激素,持续 6 个月,11 月 15 日停止给药。每日投喂二次,上午投喂定量含量含激素饲料,下午补足一天的饲料量。

1.2.2 样品制备

于 6 月-9 月从各实验组随机取 4 尾,10 月至翌年 3 月每组取 10 尾,每尾鱼都是在麻醉后,测体长,称体重,解剖取脑、胃肠道、肌肉和靠近腹部背面,可能是性腺的组织或性腺。脑和性腺组织用 Bouin 和 Bouin-Holland 液固定 8~12 h,石蜡包埋,切片厚度 6~7 μm ,H. E 染色,用以分析性腺发育情况和 17-雌二醇(17-estradiol, E_2)对性腺发育影响机理的免疫细胞化学研究。称取胃肠道和肌肉各 1 g,在塑料离心管中,低温储存。从 10 月开始,每尾鱼都采 1 mL 血样,经离心后,取上层液血清,放于 1 mL 离心管中,低温保存,用于测定胃肠道和肌肉是否残留性激素以及检查血液中性激素含量的变化。

1.2.3 放射免疫测定

取 11 月、12 月和 1 月制备的胃肠道和肌肉样品,每种组织用电子分析天平准确称 0.5 g,在玻璃匀浆器中制成匀浆,然后加入 3 mL 乙酸乙酯(分析纯,重蒸)混旋,静置分层后,吸出上层液(乙酸乙酯层)至另一试管。如此重复一次,收集两次抽提液,用空气泵在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中吹干,接着在蒸干的试管内加 2 mL 巴比妥缓冲液(0.04 M, pH 值为 8.6),后在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,待样品收集完毕,与血样一起进行放射免疫测定。17-雌二醇放射免疫测定法按赵维信等^[4]报道方法进行。

2 结 果

2.1 鲮鱼性分化时间

鲮鱼苗自投喂 17-雌二醇后,每月随机抽样检查结果表明,鲮鱼性分化时间约在投药后 3 个月,即 8 月份,在高和低剂量组随机采集样品中,只见到低剂量组有 1 尾体长 16.5 cm,体重 88.5 g,在它的性腺切片中看出卵原细胞已开始发育(图版-1),其特点是细胞为卵圆形或不规则形,核为圆形,约占整个细胞的 1/2~4/5,核内有 1~2 个核仁,胞质较少,着色较深,呈嗜碱性,平均胞径 26.9 \pm 5.4 μm (21.0~37.3 μm),平均核径 16.7 \pm 3.1 μm (14.0~23.3 μm),其余 5 尾(体长 14.7~15.8 cm)的组织切片都未见有生殖细胞,对照组也尚未出现性分化。在 9 月的抽样检查中已发现高、低剂量组都见到原始的卵原细胞,而对对照组样品切片中只观察到一尾鱼体长 21.0 cm,体重 14.1 g,出现原始的精原细胞(图版-2),其特点是:精原细胞被结缔组织所围绕,呈小叶状排列。细胞为卵圆形和椭圆形,核约占整个细胞 70%左右,核内有 1~2 个核仁,偏于一侧,胞质稀少,胞径 8.4~14.0 μm ,核径 7.9~13.6 μm 。表明鲮鱼雄性性分化时间比雌性更迟。

2.2 17-雌二醇对雌性化的影响

从 10 月开始,鲮鱼性腺已完全分化,现将 10 月至次年 3 月(2 月份未取样),三组鲮鱼性腺样品切片

观察的结果列于表 1。从表中可见,(1)高剂量组为全雌鲮鱼,其特点是:在早期卵巢中可见各种大小不同的卵原细胞和卵母细胞,大的卵原细胞胞径 26.8~33.7 μm ,核径 16.3~23.8 μm ,小的卵原细胞胞径 9.8~19.6 μm ,核径 7.7~11.7 μm ,正在生长发育的卵母细胞胞径 52.5~67.3 μm ,核径 25.7~33.6 μm ,核与胞质比例增加。从 11 月开始,卵巢进入小生长期,卵母细胞体积增加,胞径 60.3~75.8 μm ,核径 29.2~37.7 μm ,细胞为椭圆形或不规则形,核内有多个核仁紧贴核内膜,最长达 14 个,为核仁周期,是小生长期卵母细胞典型的特征,并可见核仁通过核孔外排,表明卵母细胞处于旺盛代谢活动(图版 - 3)。此期另一个特点是卵母细胞胞质中出现染色深的网状带(图版 - 4);(2)低剂量组在 10 月的 5 尾鲮鱼性腺切片观察结果全为雄性。在 11 月雌性占 60%,它的特点是卵巢中有少量卵原细胞,而大量原始的卵原细胞正在发育,核大,为圆形,核内有多个细的染色质颗粒贴近核内膜,一些卵原细胞正在进行有丝分裂,增加细胞数量(图版 - 5),其余雄性精巢特点是各个生精小管已形成,每个小管基部有多个精原细胞,核大为圆形,核内有许多细的染色质颗粒,并可见支持细胞(sertoli cell)贴近精原细胞(图版 - 6)。从 12 月以后,雌性比例显著增加,达 90%以上,翌年 3 月抽查的鲮鱼性腺样品已全为雌性;(3)对照组鲮鱼从性分化后抽样检查结果,自始至终全为雄性,其精巢发育过程是,在 11 月生精小管开始形成,靠近生殖上皮精原细胞胞囊,内有 3~5 个精原细胞(图版 - 7),此情况持续至翌年 3 月,但精原细胞已开始发育分化,根据精原细胞大小和分布位置可区分两种精原细胞,A 型精原细胞,或称干细胞,紧贴生殖上皮,细胞体积最大,为椭圆形,核大,核仁居中或偏于一侧,胞质着色浅;B 型精原细胞远离生殖上皮,细胞体积较小,核为圆形,核仁居中,核内有 1~2 个核仁,胞质着色较差(图版 - 8)。

表 1 17 - 雌二醇对鲮鱼性分化的影响

Tab.1 Effect of 17 - estradiol on sex differentiation in *M. cephalus*

采样时间	组别	数量	平均体长 (cm)	平均体重 (g)	性别	性腺发育期
1999 - 10 - 20	高剂量	5	20.2	161.1	雌性	
	低剂量	5	18.6	120.1	雄性	
	对照组	5	15.5	68.3	雄性	
1999 - 11 - 15	高剂量	10	18.9	131.5	雌性	~
	低剂量	7	20.8	168.7	雌性	
		3	17.4	96.6	雄性	
	对照组	10	18.2	108.3	雄性	
1999 - 12 - 10	高剂量	10	20.1	148.3	雌性	
	低剂量	11	20.5	172.7	雌性	
		1	19.5	150.0	雄性	
	对照组	12	20.3	144.2	雄性	
2000 - 01 - 13	高剂量	8	20.5	148.4	雌性	
	低剂量	7	20.3	153.7	雌性	
		1	19.0	110.0	雄性	
	对照组	8	20.3	143.8	雄性	
2000 - 03 - 21	高剂量	8	21.7	160.0	雌性	
	低剂量	8	21.4	160.6	雌性	~
	对照组	8	19.5	136.3	雄性	

上述结果表明:(1)高剂量组十分有效地诱导性未分化的幼鱼分化为雌性;(2)低剂量组喂药后,开始为雌性,10 月为雄性,而后分化为雌性和雄性,且雌性比例明显增加,12 月达 90%以上;(3)对照组则全为雄性。

2.3 17 - 雌二醇在肌肉和胃肠道的残留量和残留时间

肌肉、胃肠道和血液中 17 - 雌二醇水平的放射免疫测定结果见表 2。从表中看出,停药初始的 11 月,17 - 雌二醇在肌肉、胃肠道和血液中含量最高,且高剂量组 > 低剂量组 > 对照组,停药后 1 个月,各组织中雌二醇含量明显下降,尤其是低剂量组与对照组差异不是十分显著,停药后 2 个月,两个剂量组

与对照组各组织中 17 - 雌二醇含量都已没有显著差异,表明 17 - 雌二醇在肌肉和胃肠道残留量低,残留时间短。

表 2 17 - 雌二醇在肌肉、胃肠道和血液中的含量

Tab. 2 The content of 17 -estradiol in the muscle, gut and blood

采样时间	剂量	肌肉 (pg. g ⁻¹)	胃肠道 (pg. g ⁻¹)	血液 (pg. mL ⁻¹)
1999 - 11 - 15	高	319.06 ±38.65	467.20 ±20.39	79.05 ±12.15
	低	210.98 ±13.96	236.62 ±17.58	42.80 ±11.40
	对照	118.46 ±12.45	103.53 ±18.03	1.67 ±9.21
1999 - 12 - 10	高	127.34 ±18.65	164.43 ±17.14	2.44 ±3.27
	低	70.65 ±15.89	77.03 ±12.94	1.73 ±1.25
	对照	51.79 ±14.72	52.45 ±16.98	1.71 ±1.12
2000 - 01 - 13	高	68.87 ±20.57	70.58 ±14.94	2.25 ±2.18
	低	56.14 ±16.31	61.56 ±11.24	ND
	对照	40.50 ±12.59	47.25 ±13.81	ND

注:ND 表示含量极低而检测不出;E₂ 含量用平均值 ±标准差表示(n=4)。

3 结论

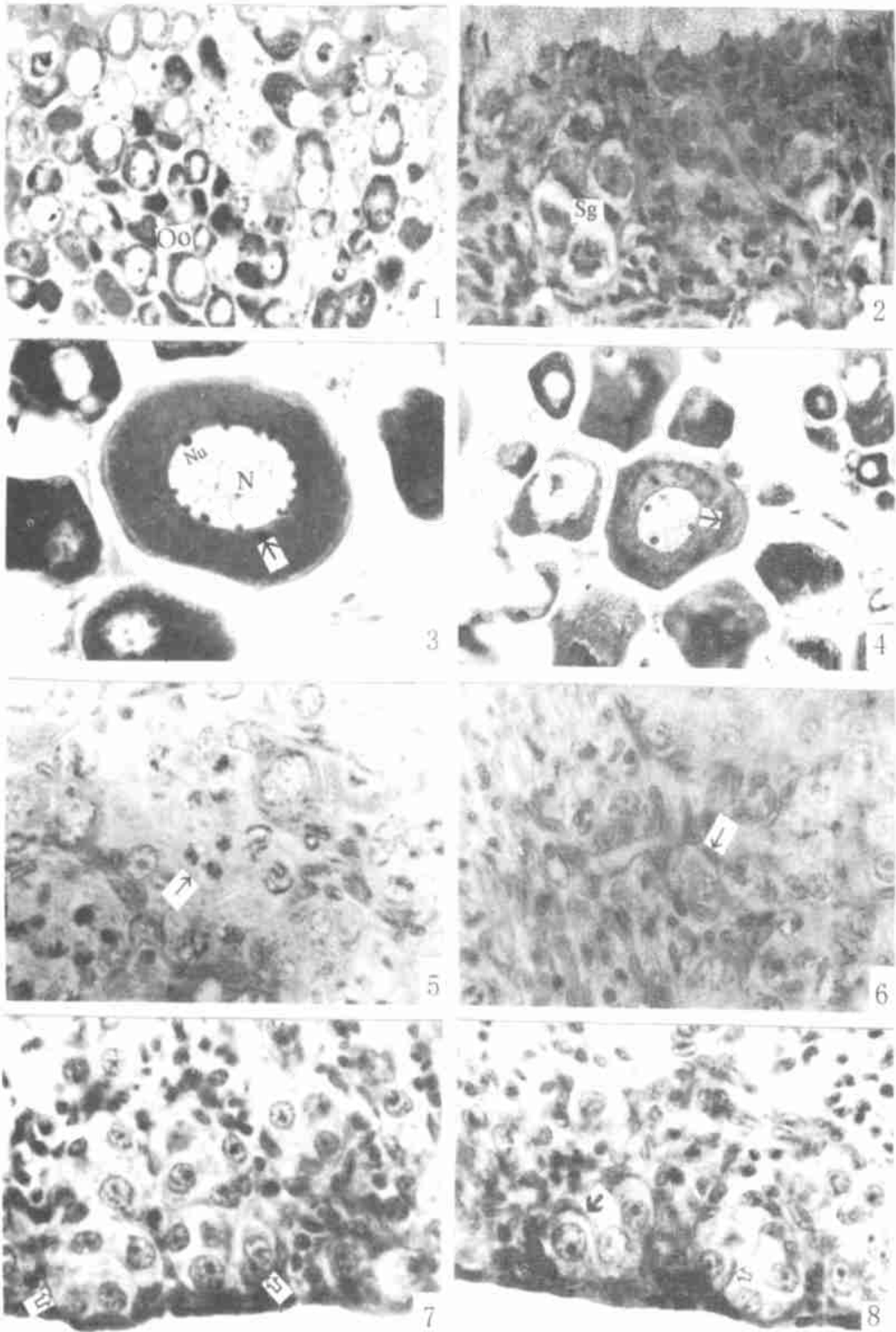
本文报道的给性腺尚未分化的幼小鲮鱼投喂拌有 17 - 雌二醇的饲料,可诱发其雌性化,此情况与两栖类相类似^[5,6]。在高剂量组,雌二醇十分有效地诱导其向雌性化发育,有效率达 100%,与我国台湾学者 Chang 等^[2]报道相比较,给药时间短 2 个月,E₂ 剂量少 2.5 倍。从低剂量组诱导的雌性率来看,E₂ 剂量偏低,摄食不均,出现性分化不稳定,抽样检查开始为雌性,尔后为雄性,随给药时间延长,才稳定转向雌性方向,说明性分化与 E₂ 剂量的相关性。令人费解的是,对照组每次抽样检查结果全为雄性,而不是通常人们所见到的在自然界脊椎动物雌雄性别比为 1:1,或是略有差别,这种不正常现象,其原因有待探讨。另外,放射免疫测定结果对照组肌肉和胃肠道也含有 E₂,其原因尚不清楚。其次,从放射免疫测定肌肉和胃肠道 E₂ 含量来看,在停药第一个月,E₂ 在组织中含量较高,但 2 个月后,实验组与对照组没有显示明显差异,况且这批鱼尚未达到商品鱼规格,随着继续饲养,将不存在 E₂ 残留在组织中而对人体产生影响。同时还说明 E₂ 在鱼体残留量很低,残留时间也很短。另外,血液中 E₂ 含量很低,我们认为与鲮鱼性腺尚处在 ~ 期有关。

众所周知,用传统的物理、化学和生理学(性激素处理)方法可将鱼类遗传型雄性或雌性转变为表型雄性或雌性。本文就是采用性激素处理法,其优点是方法简单可靠、效果好,便于推广。关于性激素影响性分化的机理,从新近鱼类性别调控的分子遗传学研究所取得的进展,有可能揭示其分子机制。如 Gelinas 等^[7]发现金鱼脑内存在细胞色素 P450 芳香化酶基因,Sinclair 等^[8]和 Berta 等^[9]都发现 Y 染色体上的 SRY 基因以及类固醇生成因子(steroidogenic factor)基因^[10],这些基因是参与调控鱼类性分化的关键基因。我们相信,这些学者的发现有助于搞清性激素诱导鱼类性分化的机制这个传统而又复杂的问题。

本文承上海水产大学赵维信教授协助雌二醇放射免疫测定,在此表示深切谢意。

参考文献:

- [1] 廖一久. 乌鱼完全养殖试验[J]. 台湾水产学会会刊, 1977(5): 1 - 10.
- [2] Chang C F, Lan S C, Pan B S. Feed administration of estradiol-17 β stimulates female differentiation in juvenile grey mullet *Mugil cephalus* [J]. Taiwan Zoological Studies, 1995, 34(4): 257 - 264.
- [3] 方永强, 李正森. 17 α -甲基睾酮刺激鳊鱼精子发生机制的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1988, 20: 10 - 14.
- [4] 赵维信, 谭玉钧, 姜仁良, 等. 诱导鲢排卵时性类固醇激素含量的变化[J]. 水生生物学报, 1988, 12: 212 - 218.
- [5] 游源瑛. 性激素对黑龙江林蛙性腺分化的影响[J]. 动物学杂志, 1966, 8: 75 - 76.
- [6] Chang C Y. Hormonal influences on sex differentiation in the toad, *Bufo americanus* [J]. Anat Rec, 1955, 123: 467 - 468.
- [7] Gelinas D, Pitoc G A, Callard G V. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during seasonal cycle and after steroid treatment [J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 138: 81 - 93.
- [8] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. Nature, 1990, 346(6281): 240 - 244.
- [9] Berta P, Hawking J R, Sinclair A H, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor [J]. Nature, 1990, 348(6300): 448 - 450.
- [10] Chang X T, Kobayashi T, Kajiura H, et al. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450 arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis [J]. J Mol Endocrinol, 1997, 18(1): 57 - 66.



1. 低剂量组早期卵巢,卵原细胞(Oo)×280; 2. 对照组早期精巢,精原细胞(sg)×700; 3. 高剂量组早期卵巢,卵母细胞核(N)内有14个核仁(Nu),可见核仁外排(→)×420; 4. 高剂量组早期卵巢,卵母细胞胞质中出现网状带(→)×280; 5. 低剂量组早期卵巢,卵原细胞正进行有丝分裂(→)×700; 6. 低剂量组早期精巢,Sertoli cell(→)紧贴精原细胞×700; 7. 对照组早期精巢,精原细胞胞囊(⇔)内有3~4个精原细胞×700; 8. 对照组早期精巢,生精小管中有A型(→)和B型(⇔)精原细胞×700